ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:201806.00231v1

应用 LNA-PCR 法检测乙型肝炎病毒阿德福韦酯耐药位点基因突变

张晓勇 [1]，罗前程 [2,*]

1 上海默礼生物医药科技有限公司，上海，201203

2 上海市浦东新区公利医院急诊医学科，上海，200135

【摘要】：目的 建立简便、快速、灵敏的锁核酸（Locked nucleic acid，LNA）探针实时荧光聚合酶链反应（PCR）检测方法，检测乙型肝炎病毒（Hepatitis B virus ，HBV） 阿德福韦酯（Adefovir dipivoxil，ADV）耐药相关位点（rtA181V、rtN236T）突变。**方法** 通过基因测序筛选阳性样本，进而构建 ADV rt181 和 rt236 位点野生株和突变株重组质粒，设计包含扩增阿德福韦酯 rtA181V 和 rtN236T 耐药位点在内的特异性引物和 LNA 荧光探针，以构建的重组质粒为标准品建立实时荧光 PCR 反应体系，并通过与基因测序平行检测血清样本以判断检测方法的可行性与准确性。**结果** 本实验所建立的 LNA-PCR 法能够检测 10^2 copies/mL 的 HBV 中 ADV 基因突变，同时具备较高的特异性。通过对 89 例 ADV 治疗一年后 HBV 阳性临床样本进行检测，有 8 例（8.98%）rtA181V 突变，5 例（5.61%）rtN236T 突变，2 例（2.24%）rtA181V 和 rtN236T 混合突变，检测结果与测序结果一致。**结论**：本实验所建立的 LNA-PCR 法是一种简便、快速、灵敏的基因突变检测方法，能有效的区分单碱基突变，对慢性乙型肝炎患者德福韦治疗过程中耐药突变的监控和抗病毒药物的调整具有指导意义。

【关键词】 乙型肝炎病毒；阿德福韦酯；锁核酸；突变；耐药性

【中图分类号】 R512.6+2

Establishment and clinical application of LNA-PCR assay detecting hepatitis B virus adefovir dipivoxil resistance

ZHANG Xiao-yong[1], LUO Qian-cheng[2,*]

1 Shanghai MOLE Diagnostics Co., Ltd, Shanghai, 201203

2 Department of Emergency, Gongli Hospital Affiliated to The Second Military Medical University, Shanghai, 200135

[基金项目] 上海市卫生和计划生育委员会科研项目（201640405），上海市浦东新区卫生系统优秀青年医学人才培养计划（PWRq2017-09）

* 通讯作者：罗前程，Email：luoqiancheng19@163.com

张晓勇，男，汉族，1978 出生，硕士研究生学历，中级职称，工作单位：上海市默礼生物医药科技有限公司，联系电话：13917795512，详细邮寄地址：上海市浦东新区张江路 775 弄 2 号 601

ChinaXiv合作期刊

[Abstract] Objective To develop a simple, quick and sensitive method based on the LNA (locked nucleic acid) PCR for detection of rtA181V and rtN236T mutations associated with adefovir dipivoxil (ADV) resistance of Hepatitis B virus (HBV). **Method** Built wild strains and the mutant recombinant plasmids of ADV rt181 and rt236 by gene sequencing screening positive samples, then designed the specific primers and LNA fluorescent probes (rtA181V, rtN236T) to construct recombinant plasmid for standard real-time fluorescent PCR reaction system, and determined the feasibility and accuracy of the detection method through the parallel to gene sequencing to detect serum samples. **Result** LNA-PCR assay could detect 10^2 copies/mL mutant template, with high specificity. Eighty-nine HBV DNA positive samples were from patients with ADV therapy over one year. LNA-PCR detected two (2.24%) rtA181V and rtN236T dual mutations, eight (8.98%) rtA181V mutations, five (5.61%) N236T mutations. Complete concordance between LNA-PCR and sequencing were observed with all samples. **Conclusion** LNA-PCR test is a simple, fast, and sensitive method for monitoring ADV resistant mutations of HBV in patients with chronic hepatitis B.

[Key words] hepatitis B virus; adefovir dipivoxil; locked nucleic acid; mutation; drug resistance

我国是乙型肝炎的高发区，乙型肝炎病毒的反复感染，可能导致慢性肝炎、肝硬化甚至肝癌。积极的抗病毒治疗，可以有效控制病情的进展，改善患者的预后。目前核苷类药物已广泛应用于乙型肝炎病毒的抗病毒治疗，但随着治疗时间的延长，会出现乙型肝炎病毒聚合酶基因的变异[1,2]，导致乙型肝炎病毒逃避抗病毒治疗药物的作用，进而出现病毒反弹和肝功能损害。核苷类药物中常用的阿德福韦酯是治疗乙型肝炎的一线药物，连续服用两年后的耐药率约 22%[3,4]。根据研究报道阿德福韦酯的耐药基因屏障很低，只需 1 个位点突变就会产生耐药，而这些耐药位点主要位于聚合酶逆转录结构域（RT 区）中的 B 区和 D 区，其中 B 区的 rtA181V 和 D 区的 rtN236T 为经典的阿德福韦酯耐药变异形式，rtA181V 变异是由 181 位氨基酸丙氨酸（A）突变成为缬氨酸（V），rtN236T 的变异是由 HBV 的 P 基因的第 582 位氨基酸由天冬酰胺（N）变为苏氨酸（T），二者的变异均会导致聚合酶活性部位构象发生改变进而影响 dNTPs 的结合，从而造成阿德福韦酯耐药[5,6]。本研究建立了基于锁核酸探针技术的 LNA-PCR 检测方法，

chinaXiv:201806.00231v1

chinaXiv:201806.00231v1

对选取研究对象的阿德福韦酯耐药相关的 rtA181V 和 rtN236T 突变进行检测，现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 临床资料：89 例标本收集于 2015-2017 年以来在上海市浦东新区公利医院接受阿德福韦酯治疗一年以上，且血清中 HBV DNA 高于 1×10^3copies/mL 的慢性乙型肝炎患者。诊断标准依据中华医学会传染病与寄生虫学分会、肝病学分会联合修订的《病毒性肝炎防治方案》[7]。

1.2 仪器与试剂：ABI 7500 荧光定量 PCR 仪（美国 Applied Biosystems 公司）；HBV DNA 荧光定量检测试剂（上海复星长征医学科学有限公司）；Qiagen QIAamp DNA 提取试剂盒（德国 QIAGEN 公司）；HiLo Hotstart Taq DNA 聚合酶，UNG 酶，dUTPmix（上海默礼生物医药科技有限公司）。

1.3 引物、探针设计及合成：通过从美国国家生物技术信息中心（NCBI）（http://www.ncbi.nlm.nih.gov）查阅乙型肝炎病毒 P 基因序列，应用 Beacon Designer 8.14 软件设计引物和探针，由上海辉睿生物科技有限公司合成，序列见表 1。

表 1 ADV 耐药 rtA181V 和 rtN236T 位点引物及探针序列

Table 1 Primers and probe sequences of ADV-resistant rtA181V and rtN236T sites

LNA 探针与引物	序列 （5’~3’）
181F	CACTTGTATTCCCATCCC
181R	ACCACATCATCCATATAACTG
181V	“FAM” -tctcH+Tgg+Ttc+Agttt-BHQ1
181A	HEX-tctcH+Tg+Gc+Tc+Agttt-BHQ1
236T	“FAM” -tacatt+TRa+Acc+Ctaata-BHQ1
236N	HEX-tacatt+TRa+Ccc+Ctaata-BHQ1
236F	CTCYTGGCTCAGTTTACTAGTGC
236R	CCAACTYCCAATTACATATCCCAT

1.4 质粒标准品构建：选用含有 ADV 耐药突变 rtA181V 和/或 rtN236T 样本，分别克隆含 181 位点与 236 位点的野生型和突变型片段以构建质粒[8,9]。HBV DNA 的提取严格按照提取试剂盒说明书进行，经 DNA 测序验证后。提取的高浓度质粒梯度稀释至 10^7～10^2copies/mL，分装并于-80℃备用。

1.5 基于 LNA 探针荧光定量 PCR 方法建立：经过反复试验优化，确定 rtA181V

chinaXiv:201806.00231v1

突变 LNA-PCR 反应体系包括 HBV DNA 模板 5μL，10mM 引物 181F、181R、181V、181A 分别为 0.5μL、0.5μL、0.3μL、0.2μL，10mM dUTPmix 0.5μL，10×Buffer 5μL，25mM Mg^{2+} 4μL，20U/μL UNG 酶 0.4μL，5U/μL Taq 酶 0.4μL，加水补至总反应体积为 50μL。

rtN236T 突变 LNA-PCR 反应体系包括 HBV DNA 模板 5μL，10mM 引物 236F、236R、236T、236N 分别为 0.5μL、0.5μL、0.3μL、0.2μL，10mM dUTPmix 0.5μL，10×Buffer 5μL，25mM Mg^{2+} 4μL，20U/μL UNG 酶 0.4μL，5U/μL Taq 酶 0.4μL，加水补至总反应体积为 50μL。

反应条件均为：95℃反应 10min 后，95℃ 30s，55℃ 60s，循环 45 次，于 55℃ 60s 时收集荧光信号。

1.6 质量控制及结果判断：

样本检测过程控制：1）阳性对照，浓度为 10^2copies/mL 的突变质粒；2）阴性对照，浓度为 10^2copies/mL 的野生型质粒；3）PCR 阴性对照，为 10ng 健康人的基因组 DNA。

结果判断及结果分析：1）阴性对照"FAM"和"HEX"通道均无扩增曲线；2）阳性对照"FAM"通道观察到"S"型扩增曲线，且 Ct 值＜38；

同时满足上述条件后，进行样本检测结果判定：1）"FAM"通道有"S"型曲线且 Ct 值＜38，"HEX"通道无曲线，表明该样本为 ADV 耐药突变样本；2）"FAM"和"HEX"通道有"S"型曲线且 Ct 值＜38，表明该样本为突变株和野生株混合样本；3）"FAM"通道无"S"曲线，"HEX"通道有曲线且 Ct 值＜38，表明该样本为野生型菌株；4）38≤Ct 值<40 的样本，需进行重复实验，3 次中有一次满足上述条件则结果有效。5）对于"FAM"和"HEX"均无"S"扩增曲线的样本，默认为待检测样本中 HBV DNA 水平低于本方法最低检测线或不存在 HBV DNA。

1.7 建立的 LNA-PCR 方法的验证：1）灵敏度验证，分别使用构建的 rtA181V 或 rtN236T 重组质粒作为标准品，从 10^7copies/mL 梯度倍比稀释至 10^2copies/mL，用于绘制标准曲线和灵敏度的测试；2）重复性验证，分别用 10^5copies/mL rtA181V、rtN236T 重组质粒重复 5 次试验，计算 *CV* 值；3）稳定性验证，将 rtA181V、rtN236T LNA 探针荧光定量 PCR 反应液，在 37℃放置 2h 进行加速破坏性试验（37℃放置 2h 相当于-20℃6 个月），之后分别加入 rtA181V、rtN236T 重组质粒 10^6copies/mL、10^5copies/mL、10^4copies/mL、10^3copies/mL、10^2copies/mL，

考察其扩增曲线的重复性；4）临床样本的检测，将收集的临床样本同时使用本实验方法和基因测序进行平行检测。

1.8 统计学方法　应用 SPSS16.0 软件统计分析数据。计量资料组间比较采用χ^2检验，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒测序

本实验构建了包含 181A（野生）、181V（突变株）、236N（野生）和 236T（突变株）质粒载体，经回收后进行酶切鉴定，酶切片段（载体为 3000bp，rt181A/V 片段大小为 67bp，rt236N/T 片段大小为 143bp）进行琼脂糖凝胶电泳检测，见图 1。经检测确认构建成功的载体进行测序，通过对比分析确认重组质粒构建成功，其中突变株 DNA 测序结果，见图 2。

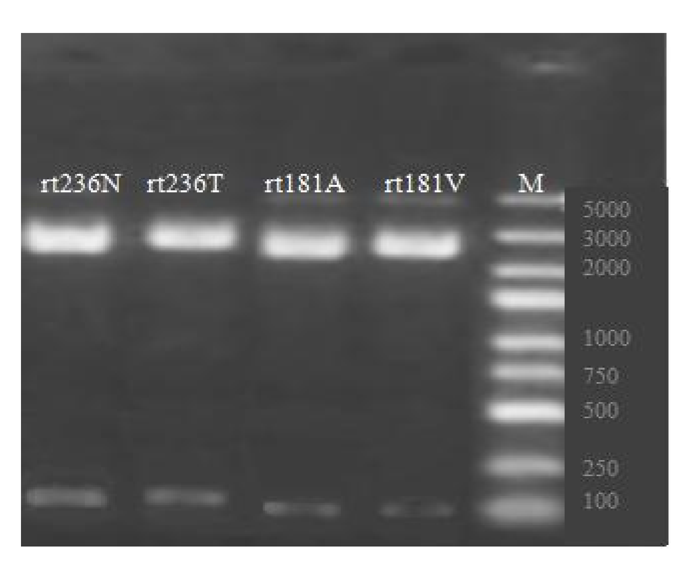


图 1 rt181A/rt181V/rt236N/rt236T 重组质粒酶切鉴定结果

Fig.1 Identification of recombinant plasmid rt181A/rt181V/rt236N/rt236T

chinaXiv:201806.00231v1

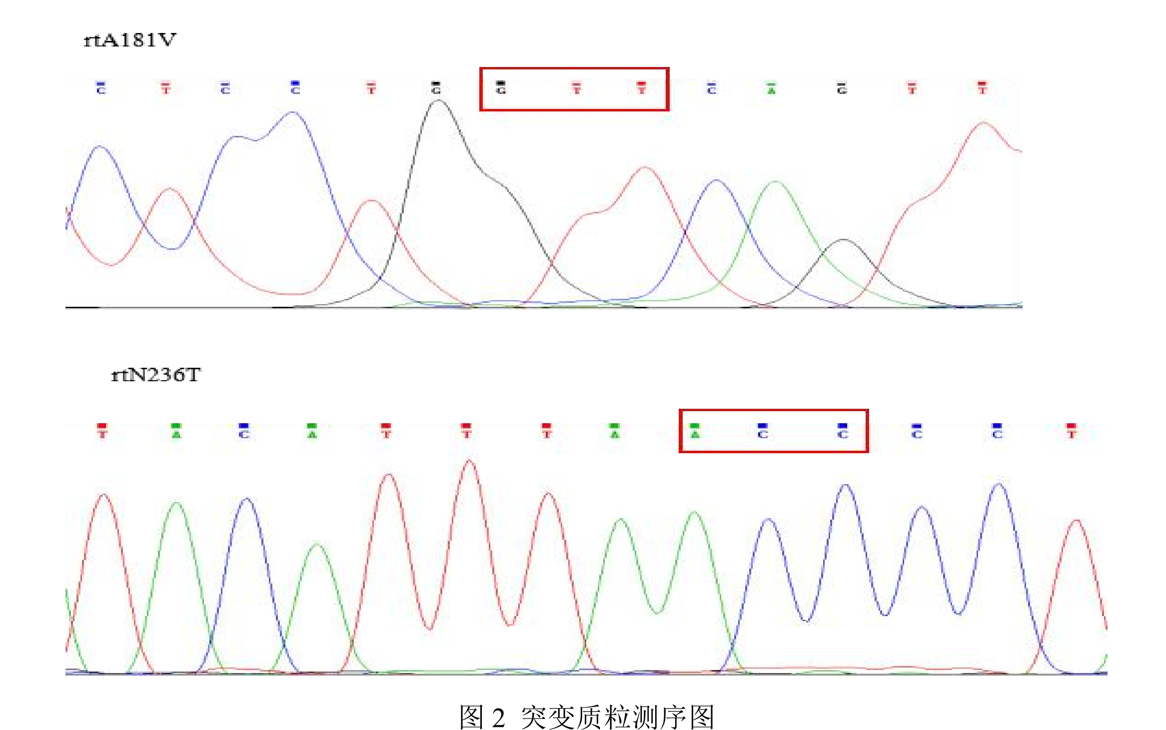
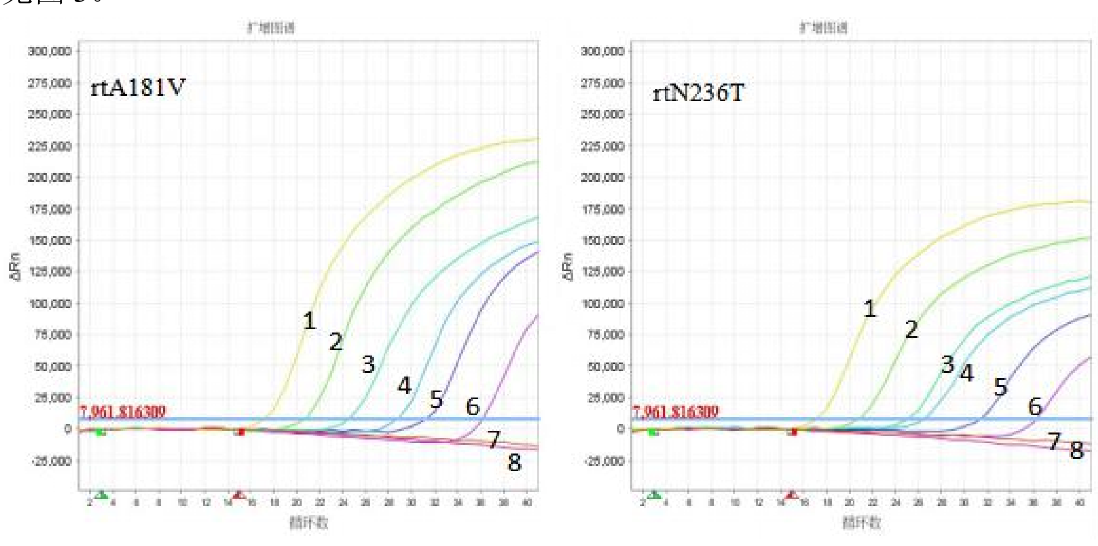


图 2 突变质粒测序图

Figure 2 Mutant plasmid sequencing (The red box indicates the mutation site)

2.2 LNA -PCR 检测能力测试

2.2.1 灵敏度：10^7～10^2 copies/mL 的 HBV ADV 突变质粒扩增曲线（rtA181V/rtN236T 扩增曲线对应的的 CT 值分别为：17.61/17.56，20.96/21.11，24.31/25.12，28.68/27.11，31.94/31.92，36.21/36.18），检测结果显示，rtA181V 及 rtN236T 重组质粒标准曲线的检测极限浓度为 10^2 copies/mL（CT 值为 36.21/36.18），表明 LNA-PCR 具有较高的检测灵敏度。同时 LNA 探针检测 10^7copies/mL 的野生型质粒在 FAM 通道观察不到“S”型曲线，与 PCR 阴性对照一致（均无 CT 值），说明能够成功的区分单碱基突变求具备较高的特异性，见图 3。



chinaXiv:201806.00231v1

图 3 LNA-PCR 检测能力测试

Figure 3 LNA-PCR detection ability test. 1 to 6 indicate the amplification curve of the HBV ADV mutant plasmid with 10^7 to 10^2 copies/mL, 7 is the PCR negative control, and 8 is the 10^7 copies/mL wild-type plasmid amplification curve.

2.2.2 重复性：经过计算，重组质粒经过 LNA-PCR 重复 5 次扩增后的 *CV* 值均小于 5%，表明该方法重复性良好，见表 2。

表 2 LNA-PCR 方法重复性试验结果

Table 2 Repeatability test results of LNA-PCR method

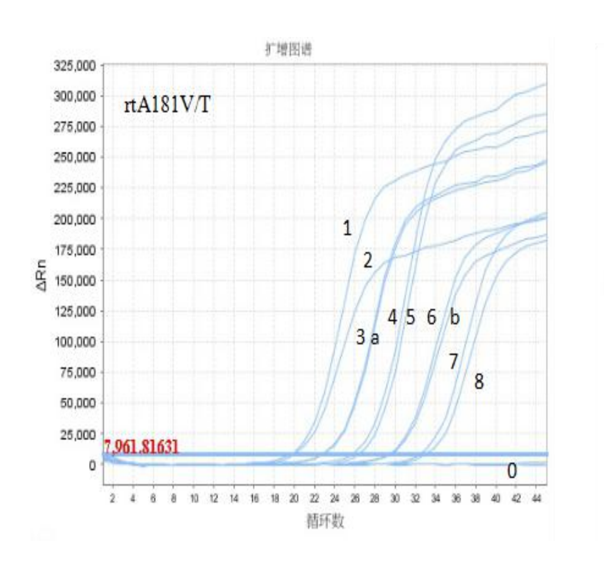
实验	重组质粒名称及对应 CT 值	
	rtA181V	rtN236T
第一次	24.37	25.11
第二次	24.40	25.19
第三次	24.45	25.17
第四次	24.41	25.16
第五次	24.39	25.18
CV 值（%）	0.12	0.12

2.2.3 稳定性：经过高温加速破坏实验，结果表明建立的 LNA-PCR 方法并不会受高温影响而改变其检测稳定性。

2.3 临床样本检测

应用 LNA-PCR 方法对 89 例临床样本进行检测。荧光 PCR 结果发现 8 例（8.98%）rtA181V 突变（分别为图中 1～8，扩增曲线对应 CT 值分别为：19.94/-，19.96/-，23.10/-，25.91/-，26.14/-，29.67/-，32.89/-，33.40/-），5 例（5.61%）rtN236T 单突变（分别为图中 9～13，样本扩增曲线对应的 CT 值分别为：19.67/-，19.67/-，22.24/-，26.32/-，29.06/-），2 例（2.24%）rtA181V 和 rtN236T 双突变（分别为图中 a 和 b，双突变样本扩增曲线对应 CT 值分别为：23.10/33.68，29.67/22.24），其检测结果与 DNA 测序结果一致。表明建立的 LNA-PCR 方法可以用于临床 HBV 的 ADV 耐药突变位点的检测。

chinaXiv:201806.00231v1



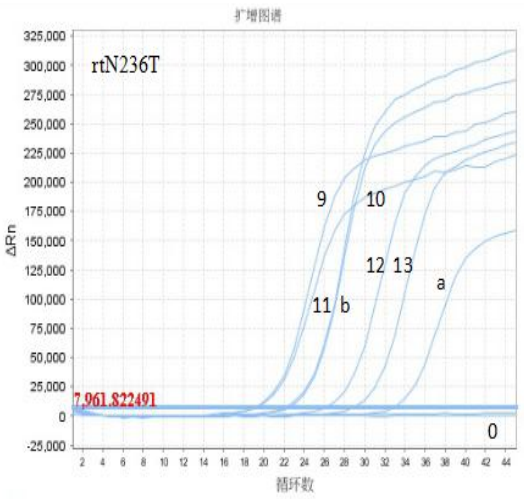


图 4　临床样本 LNA-PCR 检测结果（0 为 PCR 阴性对照）

Figure 4 Clinical sample LNA-PCR test results (0 for PCR negative control)

因此，设计的 LNA-PCR 体系能区分单碱基突变，可以用于检测 HBV 阿德福韦酯耐药突变 rtA181V 和 rtN236T 的检测。LNA-PCR 最低检测范围为 10^2copies/mL，因此待检测样本的浓度应≥10^2copies/mL。低 HBV DNA 载量的 HBV 样本，可以通过增加提取的血浆量及缩小溶解 DNA 液体的体积进行提高 HBV DNA 的检出率。

3 讨论

在长期使用核苷/核苷类药物治疗慢性乙型肝炎过程中，随着治疗时间的延长，耐药则逐渐成为一个极为重要的问题。HBV 耐药的产生不仅导致疾病进一步发展并且增加肝癌的风险，同时增加长期治疗的成本。因此在抗病毒药物治疗过程中，应定期监测耐药突变的产生，并及时调整治疗方案[10,11]。

阿德福韦酯作为治疗乙肝的一线药物，同时也是拉米夫定耐药患者的首先药物，有研究结果显示服用 ADV 两年耐药率达 2.0%，服用五年耐药率达 22%[12-15]。ADV 耐药突变位点很多，主要是在 HBV 的 P 基因区 rtA181V 和 rtN236T 突变。由于 HBV 核酸在复制过程缺乏严谨性，因此 HBV 病毒基因的多态性和突变位点较多，设计 LNA 探针检测 rtA181V 时需要考虑上游 rtL180M 突变（TCAT）和多态性（TCCT/TCTT）；为此，引入简并性探针设计思路，同样的方法设计检测 rtN236T 的 LNA 探针。也可能由于这个原因，关于荧光 PCR 方法检测 ADV 药突变报道很少[16,17]。简并性碱基的引入对探针检测 rtA181V 和 rtN236T 并无明显影响。

chinaXiv:201806.00231v1

ChinaXiv合作期刊

LNA 是一种双环状核酸衍生物，核糖的 2'-O 和 4'-C 通过缩水作用形成氧亚甲基桥，并且连成环，这个环锁定了呋喃糖 C3 内型的 N 构型，降低了核糖结构的柔韧性，增加了磷酸盐骨架的局部结构的稳定性。由于锁核酸这种特质，常见于检测 SNP 突变[18]。此外，有文献报道，应用 LNA 探针检测 HBV，其敏感性要高于其他方法[19]。本实验建立的 LNA-PCR 检测 HBV 阿德福韦酯耐药突变具有较高的检测灵敏度和特异性，可以有效的检出临床样本中的 ADV 的 rtA181V 和 rtN236T 突变，这相对于其他方法如 DNA 测序法[20,21]、LIPA 线性杂交[22,23]、基因芯片和膜条反向杂交等方法荧光 PCR 方法简单、方便和快速，适合我国临床推广和应用。

参考文献

1. Leung N. Chronic hepatitis B--treatment with nucleoside analogues[J]. Med J Malaysia, 2005, 60 Suppl B(60 Suppl B):22-27.
2. Fung J, Seto W K, Lai C L, et al. Extrahepatic effects of nucleoside and nucleotide analogues in chronic hepatitis B treatment[J]. Journal of Gastroenterology & Hepatology, 2014, 29(3):428–434.
3. Fung S K, Chae H B, Fontana R J, et al. Virologic response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B ☆[J]. Journal of Hepatology, 2006, 44(2):283-290.
4. Hass H G, Bock T, Nehls O, et al. Rapid HBV DNA decrease (week 12) is an important prognostic factor for first-line treatment with adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B.[J]. Journal of Gastroenterology, 2009, 44(8):871-877.
5. 代洁, 唐红. 阿德福韦酯耐药分子机制研究[J]. 生物医学工程学杂志, 2012(1):184-187.
Dai Jie, Tang Hong. Research on Molecular Mechanism of Drug Resistance of Adefovir Dipivoxil [J]. Journal of Biomedical Engineering, 2012(1):184-187.
6. Liu Y, Miller M D, Kitrinos K M. HBV clinical isolates expressing adefovir resistance mutations show similar tenofovir susceptibilities across genotypes B, C and D.[J]. Liver International, 2014, 34(7):1025-1032.
7. 中华医学会传染病与寄生虫病学分会,肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案 [J]. 中华肝脏病杂志, 2000,8(6):324 329.
Chinese Society of Infectious Diseases and Parasitology and Chinese Society of Hepatology of Chinese Medical Association. The programme of prevention and cure for viral hepatitis [J]. Chinese Journal of Hepatology, 2000,8(6):324 329.
8. 王泽, 唐景峰. 乙型肝炎病毒阿德福韦酯耐药多重荧光聚合酶链反应检测方法的建立及临床应用[J]. 实用医技杂志, 2015(3):240-245.
Wang Ze, Tang Jingfeng. Development and clinical application of multiple fluorescent polymerase chain reaction methods for detection of adefovir dipivoxil resistance related Hepatitis B virus mutations [J]. Journal of Practical Medical Techniques, 2015(3):240-245.
9. Zeng Y, Li D, Wang W, et al. Establishment of real time allele specific locked nucleic acid quantitative PCR for detection of HBV YIDD (ATT) mutation and evaluation of its application.[J]. Plos One, 2014, 9(2):e90029.

chinaXiv:201806.00231v1

ChinaXiv合作期刊

10. Hou JL. [The guideline of prevention and treatment for chronic hepatitis B: a 2015 update].[J]. Infectious Disease Information, 2011, 23(12):888-905.

11. Ou X, Wang X, Wu X, et al. [Comparison of FibroTouch and FibroScan for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis B patients].[J]. Zhonghua gan zang bing za zhi = Zhonghua ganzangbing zazhi = Chinese journal of hepatology, 2015, 23(2):103-106.

12. Angus P, Vaughan R, Xiong S, et al. Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase.[J]. Gastroenterology, 2003, 125(2):292-297.

13. Coffin C S, Mulrooneycousins P M, Peters M G, et al. Molecular characterization of intrahepatic and extrahepatic hepatitis B virus (HBV) reservoirs in patients on suppressive antiviral therapy[J]. Journal of Viral Hepatitis, 2011, 18(6):415–423.

14. Toyama T, Ishida H, Ishibashi H, et al. Long-term outcomes of add-on adefovir dipivoxil therapy to ongoing lamivudine in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B.[J]. Hepatology Research, 2012, 42(12):1168-1174.

15. Zeng Minde †, Mao Yimin ‡, Yao Guangbi †, et al. Five years of treatment with adefovir dipivoxil in Chinese patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B[J]. Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver, 2012, 32(1):137-146.

16. Afshar R M, Mollaie H R. Use of ALLGIO probe assays for detection of HBV resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B, Kerman, Iran.[J]. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp, 2012, 13(11):5463-5467.

17. Hsiao C C, Chang J, Wu J Y, et al. High-resolution melting and real-time PCR for quantification and detection of drug-resistant HBV mutants in a single amplicon.[J]. Antiviral Therapy, 2012, 17(2):291-303.

18. Hu Y, Le L R, Young G P. Detection of K-ras mutations in azoxymethane-induced aberrant crypt foci in mice using LNA-mediated real-time PCR clamping and mutant-specific probes.[J]. Mutation Research, 2009, 677(1–2):27-32.

19. Wang Q, Wang X, Zhang J, et al. LNA real-time PCR probe quantification of hepatitis B virus DNA.[J]. Experimental & Therapeutic Medicine, 2012, 3(3):503-508..

20. Liu Y, Liu W, Li X, et al. Screening and identification of a novel adefovir dipivoxil resistance associated mutation, rtN236V, of HBV from a large cohort of HBV-infected patients[J]. Antiviral Therapy, 2014, 19(6):551-558.

21. Ismail A M, Ramachandran J, Kannangai R, et al. Antiviral efficacy of adefovir dipivoxil in the treatment of chronic hepatitis B subjects from Indian subcontinent[J]. Indian Journal of Medical Microbiology, 2014, 32(1):60-63.

22. Wang Y Z, Xiao J H, Ruan L H, et al. Detection of the rtA181V/T and rtN236T mutations associated with resistance to adefovir dipivoxil using a ligase detection reaction assay[J]. Clinica Chimica Acta, 2009, 408(1–2):70-74.

23. Osiowy C, Villeneuve J P, Heathcote E J, et al. Detection of rtN236T and rtA181V/T Mutations Associated with Resistance to Adefovir Dipivoxil in Samples from Patients with Chronic Hepatitis B Virus Infection by the INNO-LiPA HBV DR Line Probe Assay (Version 2)[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44(6):1994-1997.

chinaXiv:201806.00231v1